

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Präparation und Charakterisierung von Hirnkapillarendothelzellen

Die Präparation der Endothelzellen (4.1.1) beruhte auf einer zweistufigen, enzymatischen Freisetzung der Zellen aus der Gefäßmatrix und anschließender Dichtegradienten-Zentrifugation.

Im ersten enzymatischen Schritt wurde mit der unspezifischen Protease Dispase die extrazelluläre Matrix des Kapillarrohres fast vollständig abgebaut, während die Kapillaren, die durch eine kollagenhaltige Basalmembran umgeben waren, unversehrt blieben. Im zweiten enzymatischen Schritt wurde dann die Basalmembran durch Collagenase-D abgebaut, was zu einer sukzessiven Freisetzung der Endothelzellen führte.

Pro Hirn wurde eine Ausbeute von etwa  $5 \times 10^7$  Zellen erreicht. Über eine Anfärbung der Zellen mit Fluorescein-diacetat und Propidiumiodid wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops die Zellvitalität abgeschätzt (4.1.3). Vitale Zellen setzen Fluorescein-diacetat zu Fluorescein um und erscheinen daher unter UV-Licht grün. Bei apoptotischen oder toten Zellen wird der Kern durch Propidiumiodid angefärbt, wodurch diese Zellen rot fluoreszieren und gut von lebenden Zellen differenziert werden können. Der Anteil der vitalen Endothelzellen nach einer Präparation betrug mindestens 90 %.

Da Erythrocyten durch die Dichtegradientenzentrifugation nur unvollständig entfernt werden konnten, erfolgte nach jeder Präparation eine Behandlung des Zellsedimentes mit Lysepuffer, der ein osmotisches Zerplatzen der Erythrocyten verursachte. Die vollständige Lyse wurde mit der Benzidin-Färbung (4.1.4) überprüft, die einen sehr empfindlichen Nachweis für Erythrocyten darstellt. Noch vorhandene Erythrocyten konnten durch eine blaugüne bis blaue Verfärbung identifiziert werden. Gegebenenfalls wurde die Behandlung mit Lysepuffer wiederholt, und so der Anteil der Erythrocyten in den Präparationen auf weniger als 5 % reduziert.

## **5.2 Fraktionierender Aufschluss von Hirnkapillarendothelzellen und Darstellung der Subproteome in zweidimensionalen Polyacrylamidgelen**

Für den fraktionierenden Aufschluss der Hirnkapillarendothelzellen wurde wie in 4.2.3 beschrieben vorgegangen. Die Darstellung der Subproteome in zweidimensionalen Polyacrylamidgelen erfolgte wie in 4.2.4 beschrieben. Für den Aufschluss wurde das Zellsediment zunächst mit Digitonin-Extraktionspuffer inkubiert. Nach Ramsby und Makowski (1999) resultiert diese Behandlung in einer Permeabilisierung der Membran und der Freisetzung von löslichen cytosolischen Komponenten. Die Permeabilisierung der Zellen konnte mit Hilfe der Trypanblau-Färbung (4.1.2) unter dem Lichtmikroskop verfolgt werden und so die optimale Einwirkdauer der Digitoninlösung ermittelt werden. Nach einer Inkubationszeit von 5 min waren alle Zellen lysiert und die Extraktion wurde beendet. Die zweidimensionale Auftrennung der extrahierten Proteine zeigt Abbildung 5.1.

Mit dem verbleibenden Zellsediment wurde die Phasenseparierung mit Triton X-114 durchgeführt. Homogene Triton-Lösungen separieren bei Temperaturen ab ca. 30°C in eine detergenzreiche und eine detergenzarme (wäßrige-) Phase, die durch Zentrifugation voneinander getrennt werden können. Nach der Separierung befinden sich integrale Membranproteine in der detergenzreichen Phase, während sich die löslichen Proteine in der wäßrigen Phase befinden. Einen Hinweis auf die Anreicherung hydrophiler Proteine lieferte die während der Separierungsschritte zunehmende rote Farbe der detergenzarmen Phase, die vermutlich durch die Anreicherung von Hämoglobin verursacht wurde. Gegenläufig dazu war eine sukzessive Entfärbung in der detergenzreichen Phase zu beobachten.

2-D Gele der Proteine aus der detergenzarmen- und der detergenzreichen Phase sind in Abbildung 5.2 bzw. 5.3 zu sehen.

Das nach der Phasenseparierung zurückgebliebene Sediment wurde mit SDS solubilisiert. Die zweidimensionale Auftrennung dieser Fraktion zeigt Abbildung 5.4.

Die Abbildungen 5.1 bis 5.4 stellen repräsentative 2-D Gele der einzelnen Fraktionen der Phasenseparierung dar, wie sie typischerweise erhalten wurden. In Abbildung 5.5 sind Durchschnittsgele gezeigt, die aus den mittleren Spotintensitäten aus jeweils drei Gelen einer Fraktion berechnet wurden.

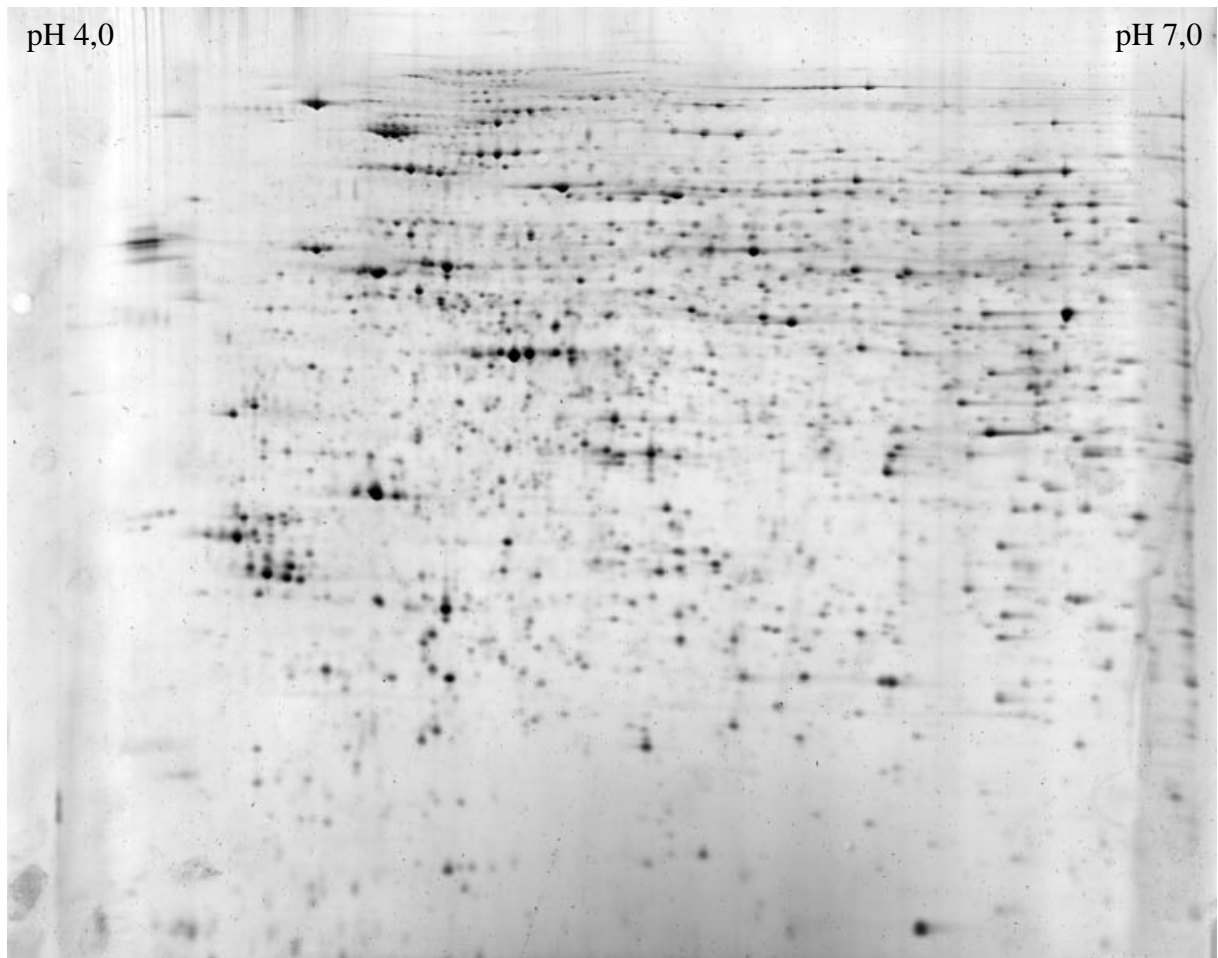


Abbildung 5.1: Repräsentatives 2-D Gel mit Proteinen aus dem Digitoninextrakt des fraktionierenden Aufschlusses von Hirnkapillarendothelzellen (150  $\mu$ g, IPG 4 – 7). Die Färbung erfolgte mit Sypro-Ruby<sup>TM</sup>.

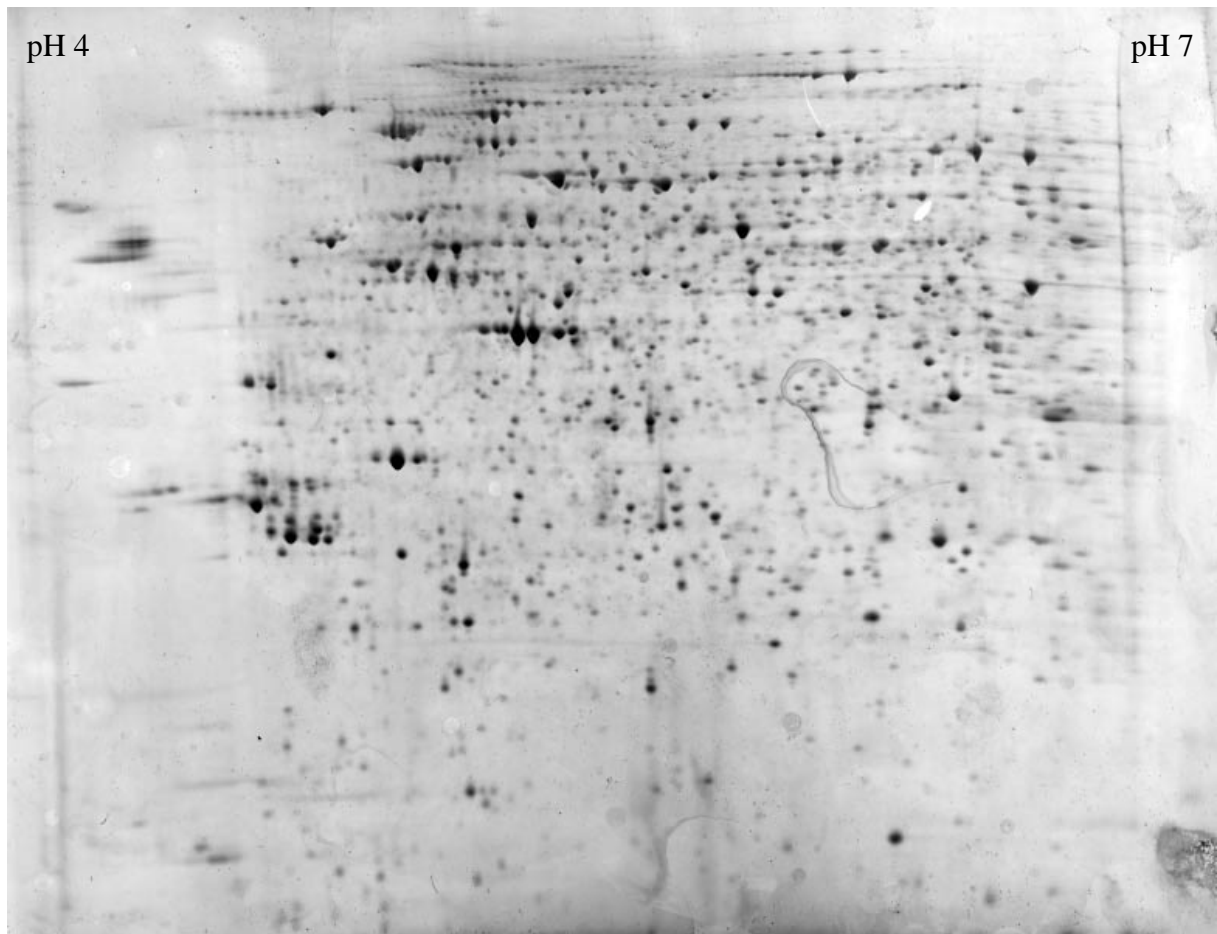


Abbildung 5.2: Repräsentatives 2-D Gel mit Proteinen aus der detergentenarmen Phase des fraktionierenden Aufschlusses von Hirnkapillarendothelzellen (150  $\mu$ g, IPG 4 – 7). Die Färbung erfolgte mit Sypro-Ruby<sup>TM</sup>.



Abbildung 5.3: Repräsentatives 2-D Gel mit Proteinen aus der detergenzreichen Phase des fraktionierenden Aufschlusses von Hirnkapillarendothelzellen (150  $\mu$ g, IPG 4 – 7). Die Färbung erfolgte mit Sypro-Ruby<sup>TM</sup>.

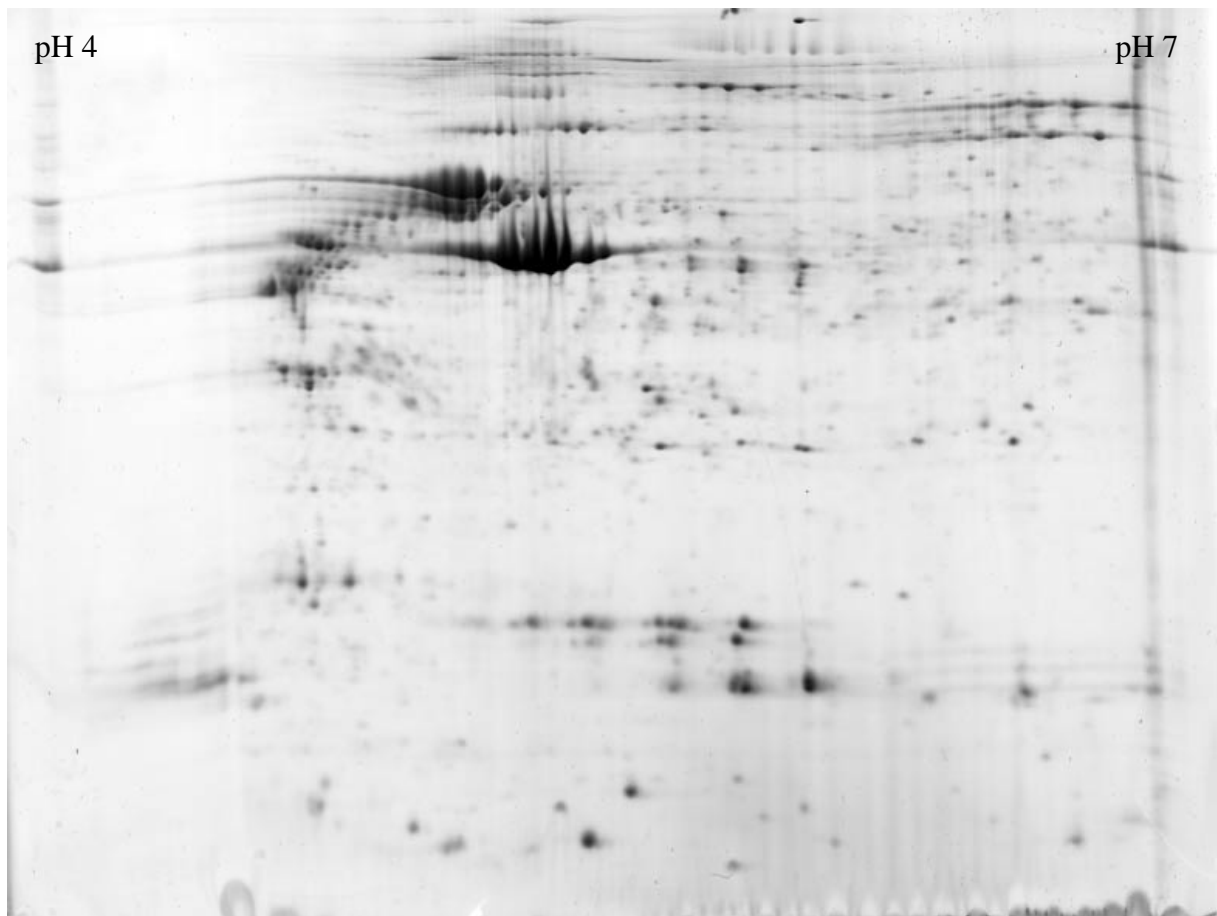


Abbildung 5.4: Repräsentatives 2-D Gel mit Proteinen aus dem SDS-Lysat des fraktionierenden Aufschlusses von Hirnkapillarendothelzellen (150  $\mu$ g, IPG 4 – 7). Die Färbung erfolgte mit Sypro-Ruby<sup>TM</sup>.

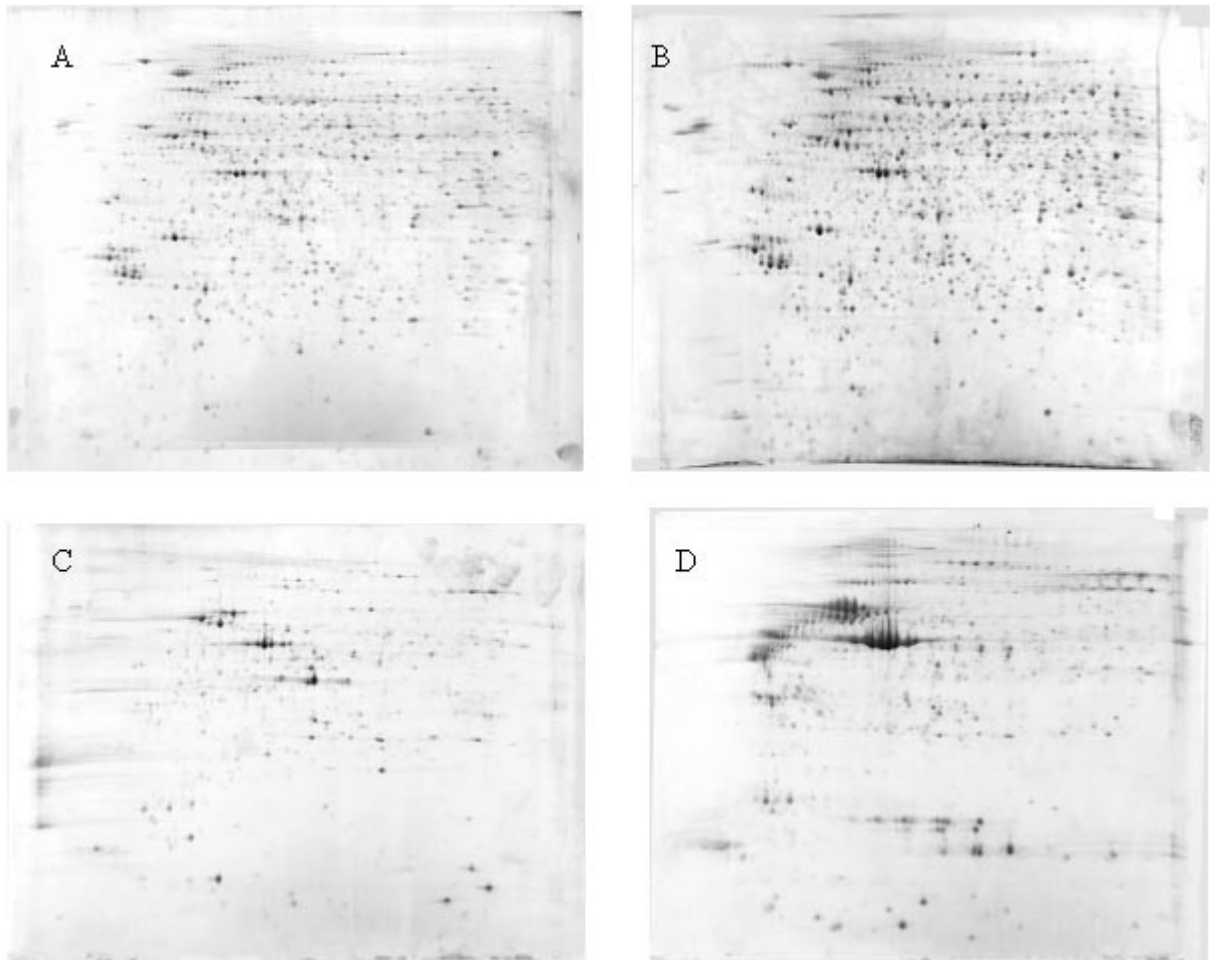


Abbildung 5.5: Durchschnittsgele aus den einzelnen Fraktionen des Aufschlusses von Hirnkapillarendothelzellen. Die Gele wurden aus jeweils drei Einzelgelen berechnet.

A: Digitonin-Extrakt

B: Detergenzarme-Phase

C: Detergenzreiche-Phase

D: SDS-Lysat

Die Gele aus dem Digitonin-Extrakt und der detergenzarmen Phase des fraktionierenden Aufschlusses weisen eine große Ähnlichkeit in ihrem Proteinmuster auf, da es in beiden Fraktionen zu einer Anreicherung hydrophiler Proteine kommt.

Die Proteinmuster auf den Gelen der detergenzreichen Phase und des SDS-Lysates sind dagegen wesentlich weniger komplex und weisen sowohl untereinander, als auch gegenüber den beiden ersten Fraktionen deutliche Unterschiede im Proteinmuster auf.

Bei der massenspektrometrischen Analyse (4.2.7) von Proteinen aus der detergenzreichen Phase des Aufschlusses konnten insgesamt 15 Proteine identifiziert werden, die entweder in der Plasmamembran, der Mitochondrienmembran oder in membranumschlossenen

Zellorganellen lokalisiert sind (Tabelle 5.1). Von den übrigen 30 Proteinen, die in dieser Fraktion identifiziert wurden, bilden 20 (Aktin, Myosin, Tubulin, Tropomyosin, F-Aktin capping Protein) Bestandteile des Cytoskeletts. Da diese Gruppe den größten Anteil aller zellulären Proteine bildet, konnte hier keine vollständige Abtrennung erreicht werden. Die übrigen 10 Proteine sind im Cytosol lokalisiert.

Tabelle 5.1: Membranproteine, membranassoziierte Proteine und Proteine in Zellorganellen, aus der detergenzreichen Phase des fraktionierenden Aufschlusses.

Protein	Lokalisation
Cytochrom b5	Membran des Endoplasmatischen Retikulums (Borgese et al., 1993)
Cytochrom c Oxidase Va	Innere Mitochondrienmembran (Denis, 1986)
ATPase $\beta$ -Untereinheit	Membran (Kaplan, 2002)
Prohibitin	Innere Mitochondrienmembran (Nijtmans et al., 2001)
SNAP-alpha	Membranassoziiert (Steel et al., 1997)
Mitofilin (3x identifiziert)	Innere Mitochondrienmembran (Gieffers et al., 1997)
GRP 78	Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (Rao et al., 2002)
Disulfid-Isomerase (2x identifiziert)	Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (Desilva et al., 1996)
Ubiquinol-Cytochrom c reductase	Innere Mitochondrienmembran (Hoffman et al., 1993)
Serin-Threonin-Phosphatase	Kern (Chen et al., 1994)
Stomatin like 2	Membranassoziiert (Owczarek et al., 2001)
Serin-Palmitoyltransferase	Membran des Endoplasmatischen Retikulums (Mandon et al., 1992)



Cytochrom b5 wird entweder membrangebunden (134 Aminosäuren) oder in einer löslichen Form (98 Aminosäuren) exprimiert, die in Erythrocyten vorkommt. Beide Formen werden durch differentielles Spleißen aus demselben primären RNA-Transkript gebildet und unterscheiden sich in einer für die membrangebundene Form spezifischen, C-terminalen, hydrophoben Domäne (Vergeres und Waskell, 1995).

Anhand der massenspektrometrischen Analyse des Proteins, konnte keine Aussage darüber gemacht werden, welche der beiden Formen identifiziert wurde. Die Unterscheidung der membrangebundenen Form von der löslichen Form war jedoch mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion (4.3.1) mit cDNA aus Hirnkapillarendothelzellen möglich.

Die mRNA der löslichen Form enthält im Gegensatz zur membrangebundenen Form eine 24 bp lange Insertion, die ein Stoppcodon enthält (Abbildung 5.6). Durch Amplifikation von cDNA aus BMEC, unter Verwendung von Primern, die diese Sequenz flankierten, konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem in BMEC exprimierten Protein um die membranständige Form handelt. Die erwarteten Produktgrößen der PCR betragen 204 bp für die lösliche Form, bzw. 180 bp für die membranständige Form des Cytochroms b5 (Abbildung 5.6).

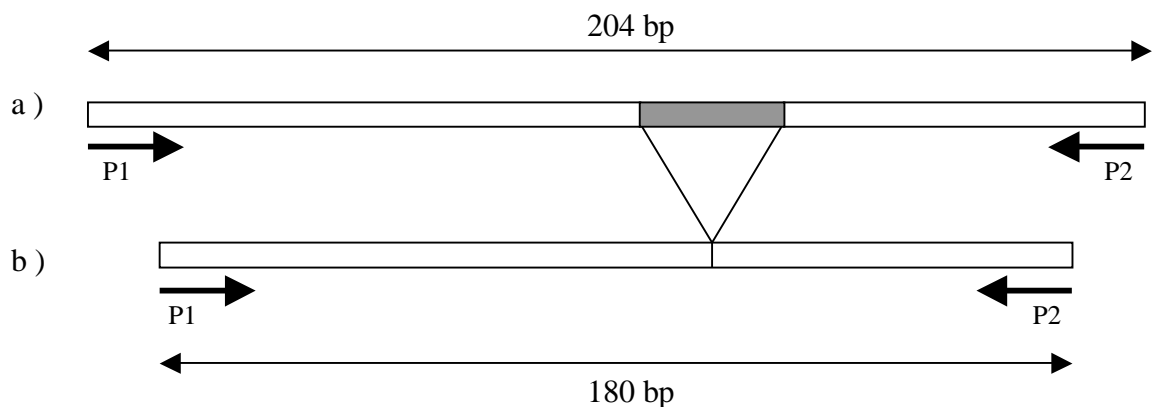


Abbildung 5.6: Schematische Darstellung der cDNA-Bereiche von Cytochrom b5, anhand denen eine Unterscheidung der löslichen und der membranständigen Form möglich ist.

a ) lösliche Form

b ) membranständige Form

Der grau unterlegte Bereich repräsentiert eine 24 bp lange, für die lösliche Form spezifische Insertion. P1 und P2 entsprechen den Bindestellen der Primer.

Die Trennung der PCR-Produkte erfolgte in einem hochauflösenden Polyacrylamidgel (4.3.3). Dabei wurden zusätzlich die Produkte einer PCR mitgeführt, bei der cDNA aus Leber als Matrize verwendet wurde. Da in Leberzellen ausschließlich die membrangebundene Form exprimiert wird (Yoo, 1997), konnte durch diesen Vergleich eine zuverlässige Unterscheidung der möglichen Produktgrößen vorgenommen werden. In Abbildung 5.7 ist eine Übereinstimmung in der Länge der PCR-Produkte aus cDNA von BMEC und Leber zu erkennen. Dadurch wird bestätigt, dass es sich bei dem Protein, das in der detergenzreichen Phase des fraktionierenden Aufschlusses identifiziert wurde, um die membranständige Form von Cytochrom b5 handelt.

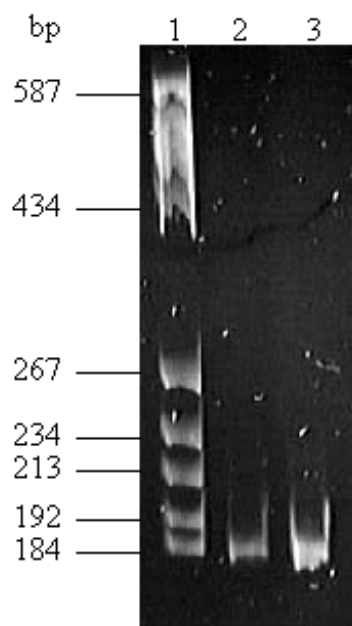


Abbildung 5.7: 5%iges Polyacrylamidgel zur Darstellung der PCR-Produkte von cDNA aus BMEC und Leber. Bei der PCR-Reaktion wurden die Primer cytb5.s und cytb5.as verwendet.

Spur 1: DNA-Längenstandard

Spur 2: PCR-Produkt von cDNA aus BMEC

Spur 3: PCR-Produkt von cDNA aus Leber

Von den Proteinen des SDS-Lysates, das die detergenzresistente Fraktion des Aufschlusses darstellt, wurden insgesamt 4 Kernproteine und ein integrales Membranprotein identifiziert. In zwei weiteren Proteinspots wurde ein potentiell membranassoziiertes Protein identifiziert, dem aufgrund des Vorhandenseins einer Kernlokalisierungssequenz (NLS) ebenfalls die Lokalisation im Zellkern zugesprochen werden kann (Tabelle 5.2).

Der Großteil der übrigen in beiden Fraktionen identifizierten Proteine besteht aus Strukturproteinen (Aktin, Myosin, Vimentin, Tubulin). Eine Übersicht über alle identifizierten Proteine geben Tabelle 5.3 (detergenzreiche Phase) und Tabelle 5.6 (SDS-Lysat).

Tabelle 5.2: Kernproteine und intergale Membranproteine aus dem SDS-Lysat des fraktionierenden Aufschlusses.

Protein	Lokalisation
ERH (Enhancer of rudimentary homolog)	Zellkern (Pogge von Strandmann et al., 2001)
BTF 3	Zellkern (Zheng et al., 1990)
hnRNP 2H9B	Zellkern (Honore, 2000)
HMG-1	Zellkern (Wen et al., 1989)
IRK 2 Channel	Membran (Wible et al., 1995)
$\alpha$ -KAP (2x identifiziert)	Membranassoziiert (?) Kern (?) (Bayer et al., 1998)

### 5.3 Proteomanalyse

#### 5.3.1 Analyse der detergenzreichen Phase des fraktionierenden Aufschlusses

Die Proteine der detergenzreichen Phase des fraktionierenden Aufschlusses wurden in zweidimensionalen Polyacrylamidgelen getrennt und massenspektrometrisch, wie in 4.2.7 beschrieben, analysiert.

Insgesamt konnten 45 Proteinspots aus dieser Fraktion identifiziert werden (Abbildung 5.8 und Tabelle 5.3).

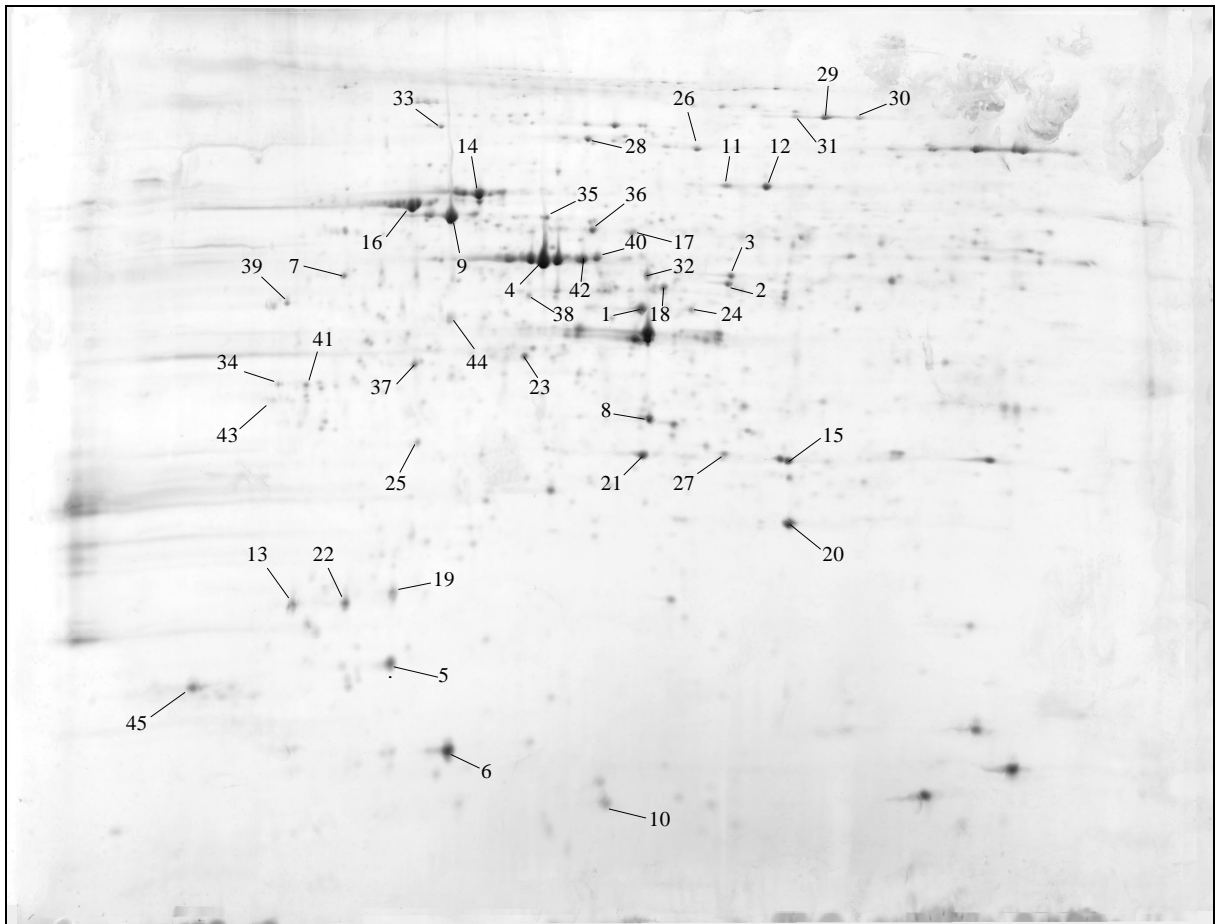


Abbildung 5.8: Durchschnittsgel mit identifizierten Proteinen aus der detergenzreichen Phase des fraktionierenden Aufschlusses von Hirnkapillarendothelzellen. Das Gel wurde aus jeweils 5 Einzelgelen berechnet.

Tabelle 5.3: Identifizierte Proteine aus der detergentenreichen Phase des fraktionierenden Aufschlusses von Hirnkapillarendothelzellen.

Nr.	Bezeichnung	kDa	pI	NCBI-nr.-Nr.
1	$\beta$ -Aktin	41,7	5,3	14250401
2	$\beta$ -Aktin	41,7	5,3	14250401
3	$\beta$ -Aktin	41,7	5,3	14250401
4	$\beta$ -Aktin	41,7	5,3	14250401
5	Cytochrom b5	14,0	5,2	89178
6	Cytochrom c Oxidase Va	12,4	5,0	117097
7	Laminin Rezeptor	32,7	4,8	34234
8	Prohibitin	28,8	5,6	246483
9	ATPase $\beta$ -Untereinheit	51,2	4,9	1374715
10	ATPase coupling Faktor F6	8,9	5,4	114689
11	ER-60 Precursor (Disulfid Isomerase)	56,6	6,1	1588744
12	ER-60 Precursor (Disulfid Isomerase)	56,6	6,1	1588744
13	Myosin leichte Kette	21,5	4,8	112009
14	$\alpha$ -Tubulin	49,0	4,9	10881132
15	Serin-Palmitoyltransferase	52,5	6,1	2564282
16	$\beta$ -Tubulin	49,8	4,8	897763
17	$\beta$ -Tubulin	49,7	4,8	12846758
18	Stomatin like 2	38,5	6,9	14603403
19	Programmed Cell Death Protein 6 (ALG-2)	21,8	5,2	12842899
20	F-Actin capping Protein	33,7	6,0	38285

Tabelle 5.3 (Fortsetzung)

Nr.	Bezeichnung	kDa	pI	NCBINr-Nr.
21	HSP 27	22,9	6,2	1170366
22	Myosin regulatory light chain	19,7	4,8	284569
23	$\alpha$ -soluble NSF attachment Protein (SNAP-alpha)	33,2	5,3	12851441
24	Aktin	41,7	5,3	14250401
25	Calpain light subunit	28,0	5,1	164403
26	HSP 70	50,4	5,6	414973
27	HSP 27 (vgl. Nr. 21)	22,9	6,2	1170366
28	Heatshock cognate protein 54 (HSC54)	53,5	5,6	11526573
29	Motorprotein (Mitofilin)	83,7	6,1	1160963
30	Motorprotein (Mitofilin)	83,7	6,1	1160963
31	Motorprotein (Mitofilin)	83,7	6,1	1160963
32	Hypothetisches Protein	37,8	5,5	10241716
33	BiP/GRP78	70,9	5,2	6470150
34	Tropomyosin 4	27,5	4,8	10441386
35	$\alpha$ -Tubulin	49,0	4,9	10881132
36	Ubiquinol-cytochrome c reductase core Protein	52,6	5,9	515634
37	Annexin V	35,9	4,9	430966
38	Serin-Threonin-Phosphatase	56,0	6,0	1122931
39	Tropomyosin	23,5	4,6	224458
40	Aktin	41,0	5,6	14250401

Tabelle 5.3 (Fortsetzung)

Nr.	Bezeichnung	kDa	pI	NCBINr-Nr.
41	Tropomyosin	28,0	4,8	37424
42	Aktin	41,0	5,6	14250401
43	Tropomyosin beta chain	28,4	4,6	136099
44	$\beta$ -Tubulin	48,9	4,7	897763
45	Myosin catalytic light chain	16,8	4,6	89245

20 der identifizierten Proteine bilden Bestandteile des Cytoskeletts. Hierzu gehören verschiedene Formen von Aktin und Myosin, das die Aktinfilamente stabilisierende Tropomyosin sowie das aktinbindende F-Aktin capping Protein. Neben diesen an der Bildung der Mikrofilamente des Cytoskeletts beteiligten Proteinen, wurde in insgesamt 5 Proteinspots  $\alpha$ -Tubulin bzw.  $\beta$ -Tubulin identifiziert, welche die Grundbausteine der Mikrotubuli darstellen.

Neben den Bestandteilen des Cytoskeletts wurden 4 verschiedene Proteine identifiziert, die eine Funktion in der Atmungskette haben. Dazu gehören das Ubiquinol-cytochrome c reductase core Protein (36), Cytochrom c Oxidase Va (6) und als ATPase Bestandteile der coupling Faktor F6 (10) und die  $\beta$ -Untereinheit des ATPase-Komplexes (9).

Eine weitere Gruppe der identifizierten Proteine bilden sogenannte Chaperone, die unter anderem für die dreidimensionale Faltung von Peptidketten während der Translation notwendig sind. Zu dieser Gruppe gehören die Heatshock-Proteine, die sowohl konstitutiv exprimiert werden als auch durch verschiedene äußere Einflüsse wie beispielsweise oxidativem Stress, Hitze oder Scheerstress induziert werden können. Heatshock-Proteine können eine Rolle bei der Proteinfaltung, der Translokation von Proteinen durch Membranen von Zellorganellen oder bei der Assemblierung von Proteinkomplexen spielen (Hendrick und Hartl, 1993). In zwei Proteinspots (21, 27) wurde das in die Gruppe der kleinen Heatshock-Proteine gehörende HSP 27 identifiziert. Ein weiterer Spot (26) wurde als HSP 70 identifiziert. Die Expression von HSP 70 kann, wie die von HSP 27, durch Hitze induziert werden. Daneben kommt es nach Verletzungen des neuronalen Gewebes zu einer starken Induktion der Expression von HSP 70.

HSC54 (Heatshock cognate, 28) wird sowohl konstitutiv als auch stressinduziert exprimiert und reguliert vermutlich die Funktion weiterer Heatshock-Proteine (Tsukahara et al., 2000).

Ebenfalls in die Gruppe der Chaparone lässt sich das glucoseregulierte Protein GRP78 (33) und die Proteindisulfidisomerase (11, 12) einordnen. Beide Proteine sind im Lumen des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert.

In der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist Prohibitin (8), das eine Funktion bei der Assemblierung von Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette hat und zur Gruppe membrangebundener Chaperone gehört. Insgesamt wurden in der detergenzreichen Phase des fraktionierenden Aufschlusses 8 Proteine identifiziert, denen eine Funktion als Chaperon bei der Faltung von Proteinen zuzuordnen ist.

Das calciumbindende Protein ALG-2 (19) ist notwendig für die T-Zell-Rezeptor-, Fas- und Glucocorticoid-induzierten Apoptose (Vito et al., 1996).

Der Laminin-Rezeptor (7) ist ein ribosomales Protein, dessen Identität mit dem Multidrug-resistance assoziierten Protein MGr1-Ag von Shi et al. (2002) nachgewiesen wurde. Ursprünglich wurde das Protein für einen Laminin-Rezeptor gehalten.

Bei der Serin-Palmitoyltransferase (15) handelt es sich um ein Schlüsselenzym bei der Biosynthese von Sphingolipiden (Weiß und Stoffel, 1997). Das in der Mitochondrienmembran lokalisierte Cytochrom b5 (5) spielt als Elektronenüberträger ebenfalls eine Rolle bei der Lipid- und Steroid-Synthese (Vergeres und Waskell, 1995).

Annexin V (37) hat als Anticoagulant eine Funktion in der Blutgerinnungskaskade (Huber et al., 1990).

Die physiologische Funktion des Stomatin like 2 Proteins (18) ist noch unklar. Über eine Rolle bei der Regulation von Ionenkanälen oder der Organisation der sogenannten *lipid rafts* wird spekuliert (Wang und Morrow, 2000).

$\alpha$ -SNAP (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, 23) ist notwendig für die Fusion von Membranen beim vesikulären Transport (Clary et al., 1997).

Die nicht lysosomale Thiolprotease Calpain (25) ist für die limitierte Proteolyse von Substraten verantwortlich, die an der Signaltransduktion und der Remodelierung des Cytoskeletts beteiligt sind.

Zwei Proteine mit bisher unbekannter Funktion wurden identifiziert. Hierbei handelt es sich um das in den Mitochondrien lokalisierte Mitofilin (Odgren et al., 1996), das in drei Proteinspots mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten identifiziert wurde (29, 30, 31) und um ein nicht näher spezifiziertes hypothetisches Protein (32, Ikegawa et al., 1999).



### 5.3.1.1 Differentieller Vergleich mit Aortaendothelzellen

Proteine die in Hirnkapillaren, nicht aber in makrovasculären Endothelien exprimiert werden, haben möglicherweise Funktionen, die im Zusammenhang mit den Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke stehen. Um einen Überblick über diese spezifisch in Hirnkapillarendothelzellen exprimierten Proteine zu erhalten, wurden jeweils 5 2D-Gele mit Proteinen aus der detergenzreichen Phase des fraktionierenden Aufschlusses von Hirnkapillarendothelzellen mit 5 Gelen mit Proteinen aus Aortaendothelzellen verglichen. Für den Vergleich wurde die Gelanalysesoftware PDQuest 7.0 verwendet. Repräsentative Gele mit Proteinen aus Aorta- bzw. Hirnkapillarendothelzellen, wie sie für den Vergleich verwendet wurden, sind in Abbildung 5.9 dargestellt.

Die Parameter für die Spotdetektion wurden mit Hilfe des automatischen Assistenten der Software an einem repräsentativen Gel erstellt und auf maximale Sensitivität bei vertretbarer Rauschunterdrückung optimiert. Die gewählten Parameter wurden an allen Gelen auf ihre Tauglichkeit getestet bevor der automatische Detektions- und Matchingvorgang begonnen wurde. Dazu wurde ein Gel als Referenzgel bestimmt, an dessen Spotpositionen und -größen alle anderen gemessen wurden. Als Referenzgel wurde das BMEC-Gel Nr. 5 ausgewählt, welches die am besten aufgelösten Spots enthielt.

Das Ergebnis des Detektions- und Matchvorgangs für alle an der Analyse beteiligten Gele ist in Tabelle 5.4 zusammengefaßt.

Tabelle 5.4: Zusammenfassung der Gelanalyse. Das Referenzgel ist mit einem \* markiert.

Gel	Spotanzahl	Matched	Matchrate [%]
BMEC 1	794	244	30
BMEC 2	1173	547	46
BMEC 3	1437	644	44
BMEC 4	1151	539	46
BMEC 5*	1159	1159	100
AOEC 1	899	167	14
AOEC 2	1205	149	12
AOEC 3	782	94	8
AOEC 4	762	160	13
AOEC 5	1026	85	7

Von den Gelen AOEC 1 – 5 ließen sich durchschnittlich 10 % der Proteinspots mit denen des Referenzgels zur Deckung bringen. Von den BMEC-Gelen 1 – 4 ließen sich durchschnittlich 42 % der Proteine mit denen des Referenzgels zur Deckung bringen.

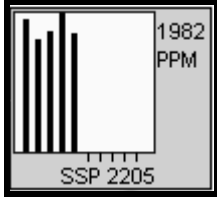
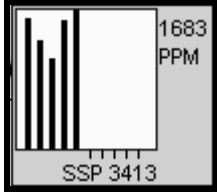
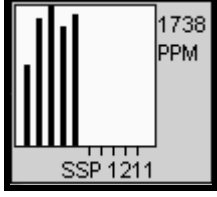
Abbildung 5.10 zeigt das sogenannte Mastergel, das aus den Daten aller in dem Experiment verwendeten Gele berechnet wurde. In der Abbildung sind die Proteinspots die nur in BMEC-Gelen detektiert wurden rot markiert (BMEC unique). Die Spots, deren Intensitäten in den BMEC-Gelen mindestens um den Faktor 2 höher sind als in AOEC-Gelen, sind grün markiert.

In der detergenzreichen Phase konnten 96 Proteine detektiert werden, deren Intensitäten in den BMEC-Gelen mindestens zweimal so hoch waren wie in den AOEC-Gelen. Von diesen hochregulierten Proteinen konnten 3 identifiziert werden. Es handelt sich dabei um Stomatin like 2 (Nr. 18), ein  $\beta$ -Aktin (Nr. 1), und um  $\alpha$ -SNAP (Nr. 23).

Insgesamt wurden 41 nur in BMEC exprimierte Proteine aus der detergenzreichen Phase detektiert, von denen 3 identifiziert werden konnten (Tabelle 5.5).

Tabelle 5.5: Identifizierte BMEC unique Spots der detergenzreichen Phase. Die Histogramme geben die Intensität des jeweiligen Spots in jedem Gel an.

SSP: Von der Analysesoftware generierte Standardspotnummer

Spot-Nr.	Bezeichnung	Histogramm
25	Calpain, leichte Untereinheit	
38	Serin-Threonin-Phosphatase	
41	Tropomyosin	

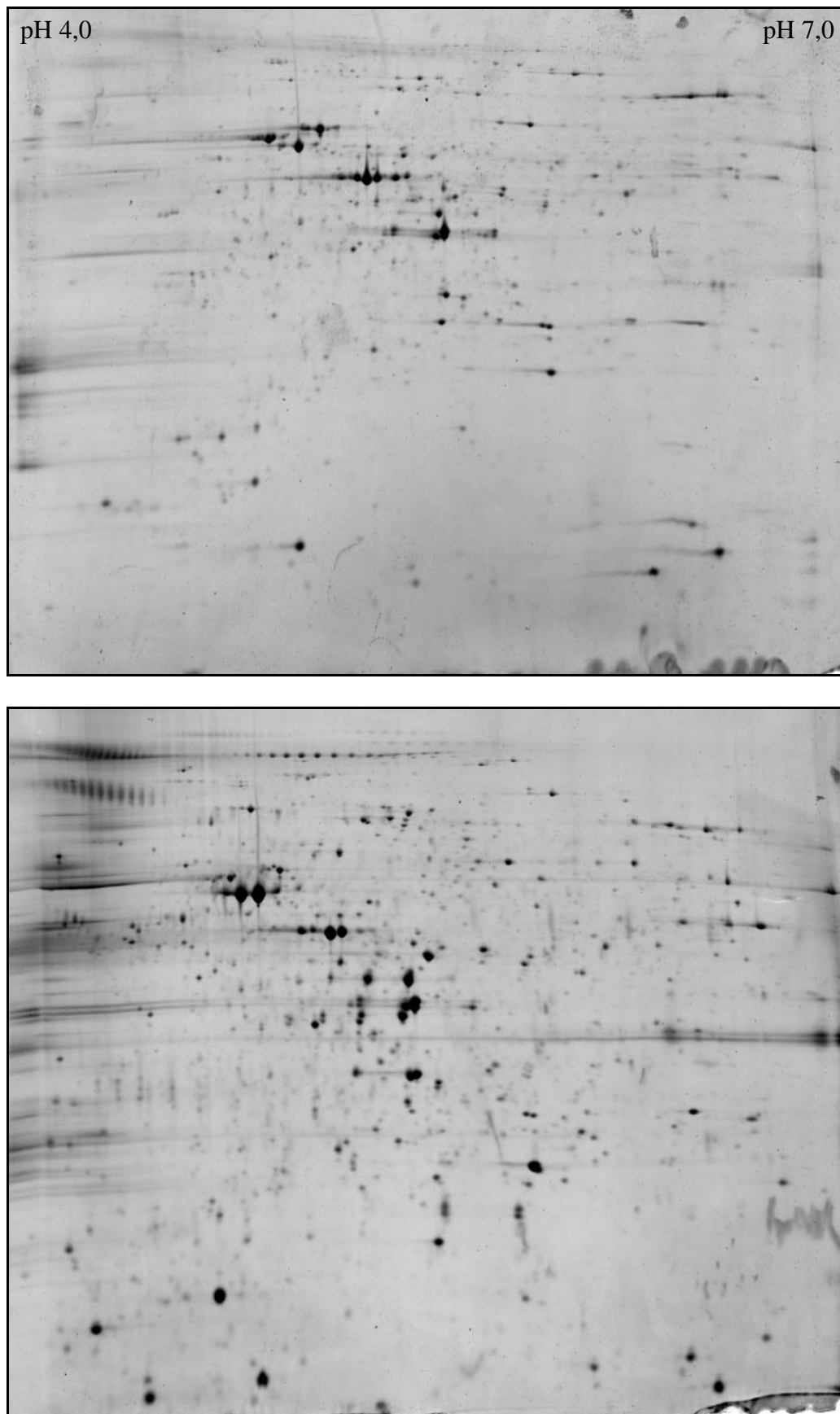


Abbildung 5.9: Repräsentative Gele von BMEC (oben) und AOEC (unten). Detergenzreiche Phase, (150 µg, IPG 4 – 7). Die Färbung erfolgte mit Sypro-Ruby™.



Abbildung 5.10: Mastergel der differentiellen Analyse von BMEC und AOEC (detergenzreiche Phase). Rot: BMEC unique Spots, Grün: in BMEC hochregulierte Spots.

Die in Tabelle 5.5 dargestellten Histogramme geben die Intensitäten der differentiell exprimierten Spots in jedem BMEC-Gel an. Dabei wurden die Intensitäten aller Spots addiert und das Volumen des einzelnen Spots als relativer Anteil an der errechneten Gesamtmenge aller Spotintensitäten ausgedrückt. In den AOEC-Gelen wurden an den entsprechenden Stellen keine Proteine detektiert.

Da zum Zeitpunkt der Untersuchung kein Vergleichsgewebe zugänglich war, mußten die zu analysierenden Spots ausgewählt werden, bevor die differentielle Analyse durchgeführt werden konnte. Da die Auswahl der Spots zufällig erfolgte, wurde nur ein Teil der differentiell exprimierten Proteine identifiziert.

### 5.3.2 Analyse des SDS-Lysates des fraktionierenden Aufschlusses

Die Proteine des SDS-Lysates des fraktionierenden Aufschlusses wurden in zweidimensionalen Polyacrylamidgelen getrennt und massenspektrometrisch analysiert, wie in 4.2.7 beschrieben

Insgesamt konnten 23 Proteinspots aus dieser Fraktion identifiziert werden (Abbildung 5.11 und Tabelle 5.6).

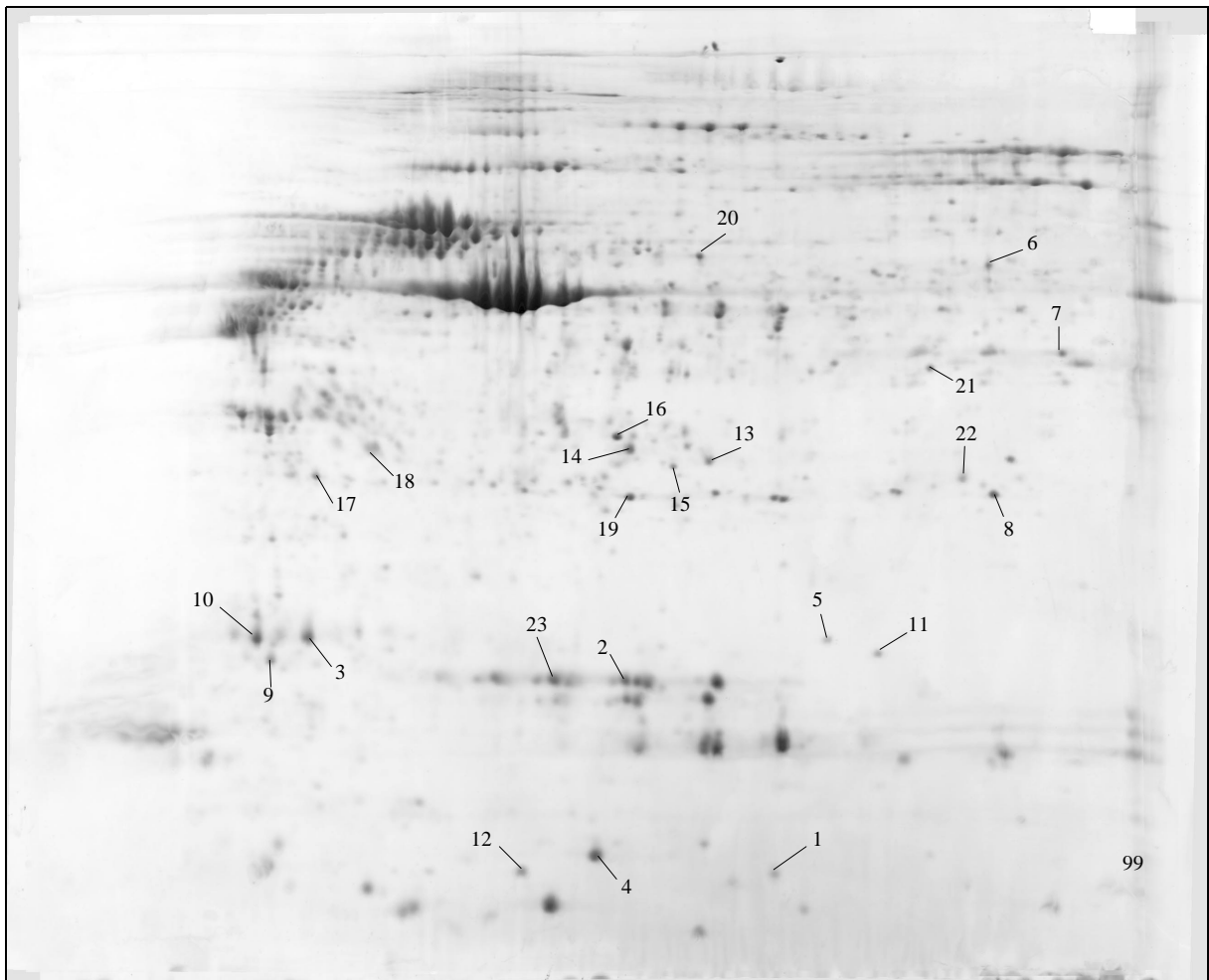


Abbildung 5.11: Durchschnittsgel mit identifizierten Proteinen aus dem SDS-Lysat des fraktionierenden Aufschlusses von Hirnkapillarendothelzellen. Das Gel wurde aus jeweils 5 Einzelgelen berechnet.

Tabelle 5.6: Identifizierte Proteine aus dem SDS-Lysat des fraktionierenden Aufschlusses von Hirnkapillarendothelzellen.

Nr.	Bezeichnung	kDa	pI	NCBINr-Nr.
1	Rbm3	13,6	6,8	3395381
2	$\alpha$ -KAP	22,6	6,4	1143517
3	Myosin regulatory light chain	19,7	4,8	284569
4	Enhancer of rudimentary homolog	12,3	5,3	1588299
5	BTF3	17,3	6,0	14042661
6	EIF-4A2 homolog	46,8	6,1	496902
7	HnRNP 2H9B	31,5	6,8	7739445
8	HSP27	22,9	6,2	1170366
9	Myosin regulatory light chain	21,5	4,7	112009
10	Myosin regulatory light chain	21,5	4,7	112009
11	Actin related Protein 2/3 complex	16,9	6,2	12654001
12	$\beta$ -Actin	8,4	5,5	15553463
13	$\gamma$ -Actin	25,8	5,6	178045
14	Actin	41,8	5,2	71616
15	Vimentin	53,7	5,1	37850
16	Vimentin	53,7	5,1	37850
17	Vimentin	53,7	5,2	289450
18	Actin	26,1	5,1	12848875
19	IRK 2	46,6	5,5	6624203
20	Actin related Protein	47,3	5,5	11835802
21	$\beta$ -Actin	41,0	5,6	14250401
22	HMG-1	24,2	7,0	6572242
23	$\alpha$ -KAP	22,6	6,4	1143517

13 der identifizierten Proteine bilden Bestandteile des Cytoskeletts. Hierzu gehören neben verschiedenen Formen von Aktin und Myosin, das Actin related Protein und verschiedene Formen von Vimentin.

Zur Familie der glycinreichen RNA-bindenden Proteine (GRP-Familie) gehört das in den meisten humanen Zelllinien konstitutiv exprimierte RBM3 (1). Unter milden hypothermischen Bedingungen kommt es zu einer verstärkten Expression dieses sogenannten *coldshock* Proteins (Danno et al., 1997). Die genaue Funktion von RBM3 ist jedoch noch nicht bekannt.

Vier im Zellkern lokalisierte ubiquitär exprimierte Proteine wurden identifiziert. Dazu gehören die Transkriptionsfaktoren HMG-1 (22), BTF3 (5) und ERH (enhancer of rudimentary homolog, 4) sowie das zur Familie der heterogenen, nukleären Ribonukleoproteinen (hnRNPs) gehörende hnRNP 2H9B (7), das an Splice-Prozessen beteiligt ist.

Der Translations-Initiationsfaktor EIF-4A2 (6) ist an der Bindung der mRNA an das Ribosom beteiligt und wird ebenfalls ubiquitär in eukaryontischen Zellen exprimiert (Sudo et al., 1995)

Bei IRK 2 (inwardly rectifying  $K^+$  Channel, 19) handelt es sich um einen sogenannten einwärts-gleichrichtenden Kalium-Kanal. Die Besonderheit dieser Kanäle besteht darin, bei konstant gehaltenem Membranpotential, Kaliumionen überwiegend von der extrazellulären zur intrazellulären Seite durch die Membran zu leiten. Ein  $K^+$ -Strom in die umgekehrte Richtung findet hingegen kaum statt. Einwärts-gleichrichtende Kaliumkanäle wurden bereits in verschiedenen Geweben nachgewiesen, unter anderem auch im Endothel arterieller Gefäße (Himmel et al., 1994).

Zweimal wurde das Protein  $\alpha$ -KAP ( $\alpha$ CaMKII assoziiertes Protein) identifiziert (2, 23). Hierbei handelt es sich um eine Isoform der gehirnspezifischen  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Kinase II ( $\alpha$ CaMKII).  $\alpha$ -KAP besitzt keine Kinase-Aktivität und wurde bisher nur im Skelettmuskel der Maus nachgewiesen. Die genaue Funktion von  $\alpha$ -KAP ist nicht bekannt. Eine mögliche Funktion als Bindeprotein für  $\alpha$ CaMKII wird diskutiert (Bayer et al., 1996). Eine weitergehende Analyse des Proteins findet in Abschnitt 5.4 statt.

### 5.3.2.1 Differentieller Vergleich mit Aortaendothelzellen

Für eine Übersicht der Proteine, die in Hirnkapillaren, nicht aber im makrovasculären Endothel exprimiert werden, sind jeweils 3 2-D Gele mit Proteinen aus dem SDS-Lysat mit 3 Gelen mit Proteinen von Aortaendothelzellen verglichen worden. Repräsentative Gele mit Proteinen aus Aorta- bzw. Hirnkapillarendothelzellen, wie sie für den Vergleich verwendet wurden, sind in Abbildung 5.12 dargestellt.

Die Parameter für die Spotdetektion wurden mit Hilfe des automatischen Assistenten der Software an einem repräsentativen Gel erstellt und auf maximale Sensitivität bei vertretbarer Rauschunterdrückung optimiert. Die gewählten Parameter wurden an allen Gelen auf ihre Tauglichkeit getestet, bevor der automatische Detektions- und Matchingvorgang begonnen wurde. Dazu wurde ein Gel als Referenzgel bestimmt, an dessen Spotpositionen und -größen alle anderen gemessen wurden. Hierfür wurde das BMEC-Gel Nr. 3 ausgewählt, welches die am besten aufgelösten Spots enthielt.

Das Ergebnis des Detektions- und Matchvorgangs für alle an der Analyse beteiligten Gele ist in Tabelle 5.7 zusammengefaßt.

Von den Gelen AOEC 1 – 3 ließen sich durchschnittlich 9 % der Proteinspots mit denen des Referenzgels zur Deckung bringen. Von den BMEC-Gelen 1 und 2 ließen sich jeweils 62 % bzw. 56 % der Proteine mit denen des Referenzgels zur Deckung bringen.

Abbildung 5.10 zeigt das Mastergel, das aus den Daten aller in dem Experiment verwendeten Gele berechnet wurde. In der Abbildung sind Spots, die nur in BMEC detektiert wurden, rot markiert. Die Spots, deren Intensitäten in den BMEC-Gelen mindestens um den Faktor 2 höher sind als in AOEC Gelen, sind grün markiert.

Tabelle 5.7: Zusammenfassung der Gelanalyse. Das Referenzgel ist mit einem \* markiert.

Gel	Spotanzahl	Matched	Matchrate [%]
BMEC 1	1158	720	62
BMEC 2	963	545	56
BMEC 3*	1290	1290	100
AOEC 1	1649	166	10
AOEC 2	1797	181	10
AOEC 3	961	81	8



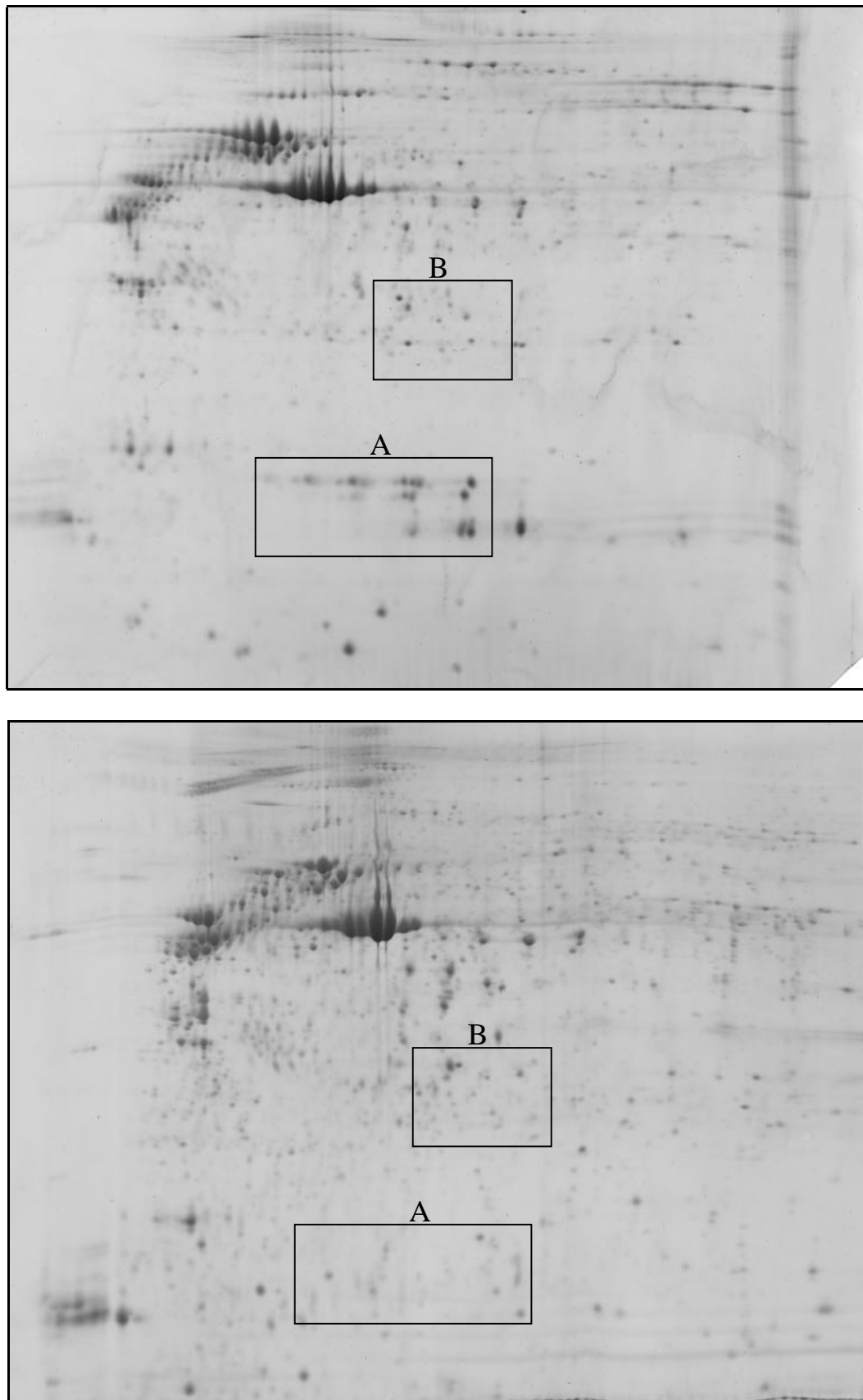


Abbildung 5.12: Repräsentative Gele von BMEC (oben) und AOEC (unten) aus dem SDS-Lysat des fraktionierenden Aufschlusses (150  $\mu$ g, IPG 4 – 7). Die Färbung erfolgte mit Sypro-Ruby<sup>TM</sup>. Die markierten Bereiche werden in Abbildung 5.15 vergrößert dargestellt.

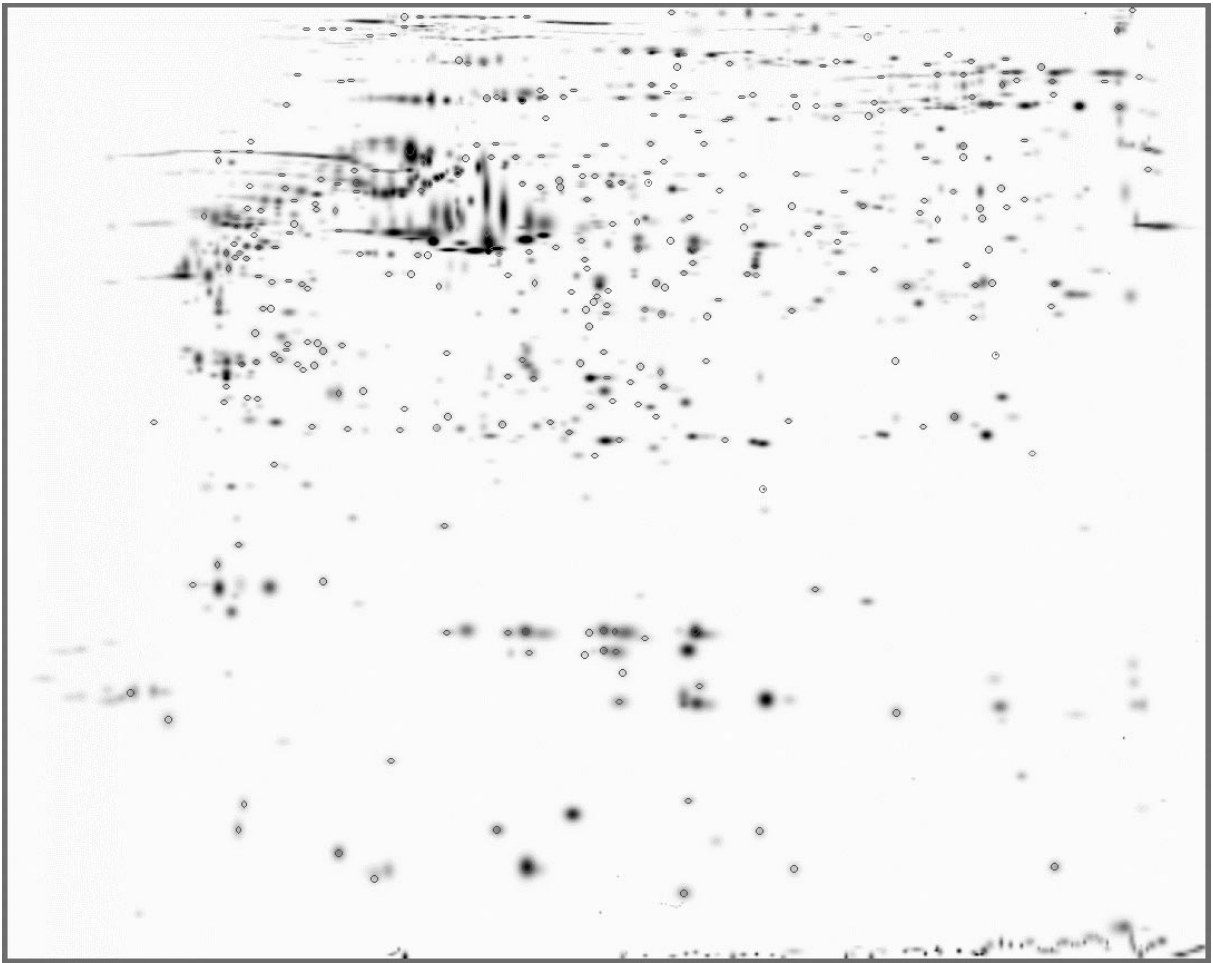


Abbildung 5.13: Mastergel der differentiellen Analyse von BMEC und AOEC (SDS-Lysat).  
Rot: BMEC unique Spots, Grün: in BMEC hochregulierte Spots.

Aus dem SDS-Lysat des fraktionierenden Aufschlusses konnten 29 Proteine detektiert werden, deren Intensitäten in den BMEC-Gelen mindestens zweimal so hoch waren wie in den AOEC-Gelen. Keines dieser hochregulierten Proteine konnte jedoch identifiziert werden.

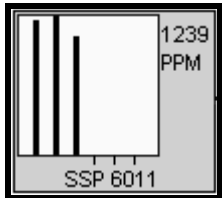
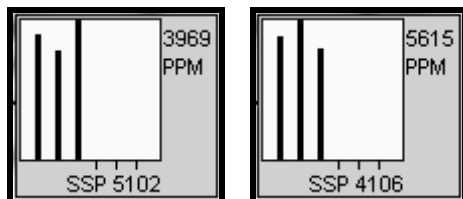
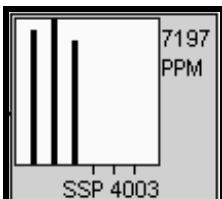
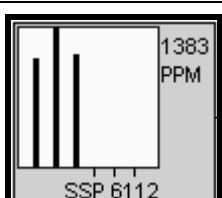
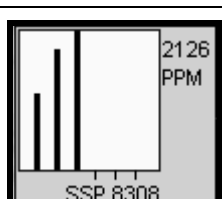
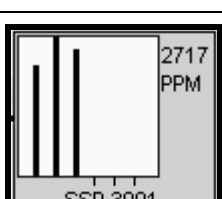
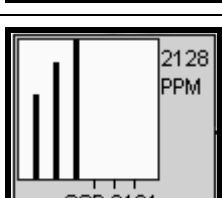
Es wurden 297 nur in BMEC exprimierte Proteine detektiert, von denen 8 identifiziert werden konnten (Tabelle 5.8). Unter den differentiell exprimierten Proteinen befindet sich auch das bereits in Abschnitt 5.3.2 erwähnte  $\alpha$ -KAP.

Da zum Zeitpunkt der Untersuchung kein Vergleichsgewebe zugänglich war, mußten die zu analysierenden Spots ausgewählt werden, bevor die differentielle Analyse durchgeführt werden konnte. Da die Auswahl der Spots zufällig erfolgte, wurde nur ein Teil der differentiell exprimierten Proteine identifiziert.

Tabelle 5.8: Identifizierte BMEC unique Spots aus dem SDS-Lysat.

Die Histogramme geben die Intensität des jeweiligen Spots in jedem Gel an.

SSP: Von der Analysesoftware generierte Standardspotnummer

Spot-Nr.	Bezeichnung	Histogramm
1	Rbm3	
2, 23	$\alpha$ -KAP Spot Nr. 2 = SSP 5102 Spot Nr. 23 = SSP 4106	
4	Enhancer of rudimentary homolog	
5	BTF	
7	HnRNP 2H9B	
12	Aktin	
22	HMG-1	

#### 5.4 Identifizierung einer gehirnspezifischen Isoform des CaMKII bindenden Proteins $\alpha$ -KAP

In den Gelen mit Proteinen des SDS-Lysates des fraktionierenden Aufschlusses von Hirnkapillarendothelzellen wurde in 2 Spots mit isoelektrischen Punkten von etwa 5,2 und 5,4 das Protein  $\alpha$ -KAP ( $\alpha$ CaMKII-Assoziationsprotein, Bayer et al., 1996) identifiziert. Bei  $\alpha$ -KAP handelt es sich um eine 25 kDa schwere Isoform der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Kinase II  $\alpha$  ( $\alpha$ CaMKII). In der Literatur gibt es bisher keinen Hinweis auf die Expression von  $\alpha$ -KAP im Gehirn. Im Unterschied zur 54 kDa schweren  $\alpha$ CaMKII, besitzt  $\alpha$ -KAP keine Kinaseaktivität. Das Protein besteht aus einer C-terminalen Domäne, die bis auf eine 11-Aminosäure lange Insertion, identisch ist mit der Assoziationsdomäne von  $\alpha$ CaMKII und einer N-terminalen Domäne, die spezifisch ist für  $\alpha$ -KAP. Die katalytische und die regulatorische Domäne von  $\alpha$ CaMKII sind in  $\alpha$ -KAP nicht vorhanden. (Abbildung 5.14).

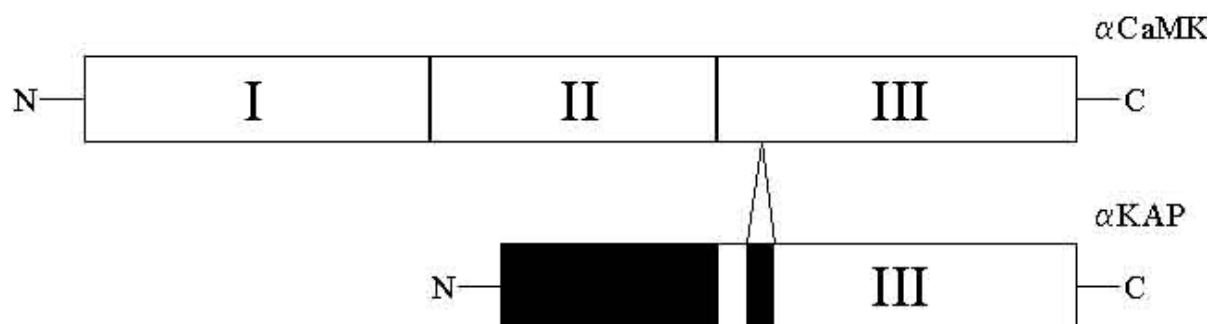


Abbildung 5.14: Schematische Darstellung von  $\alpha$ CaMKII und  $\alpha$ -KAP (Bayer et al., 1996),  $\alpha$ -KAP-spezifische Bereiche sind schwarz ausgefüllt.

I: Katalytische Domäne, II: Regulatorische Domäne, III: Assoziations Domäne

Durch die MALDI-Analyse (4.2.7) wurden aus beiden Spots jeweils 5 Peptidmassen erhalten, mit denen die Identifizierung möglich war (Abbildung 5.16). Die Peptide stammten alle aus dem C-terminalen Bereich des Proteins, das mit  $\alpha$ CaMKII identisch ist (Abbildung 5.14). Durch die Lage der Spots auf dem 2-D Gel bei einer molaren Masse von etwa 25 kDa war jedoch eine Unterscheidung zur  $\alpha$ CaMKII und damit die eindeutige Identifizierung möglich. Beim differentiellen Vergleich konnte keiner der beiden als  $\alpha$ -KAP identifizierten Spots in Aortaendothelzellen gefunden werden.

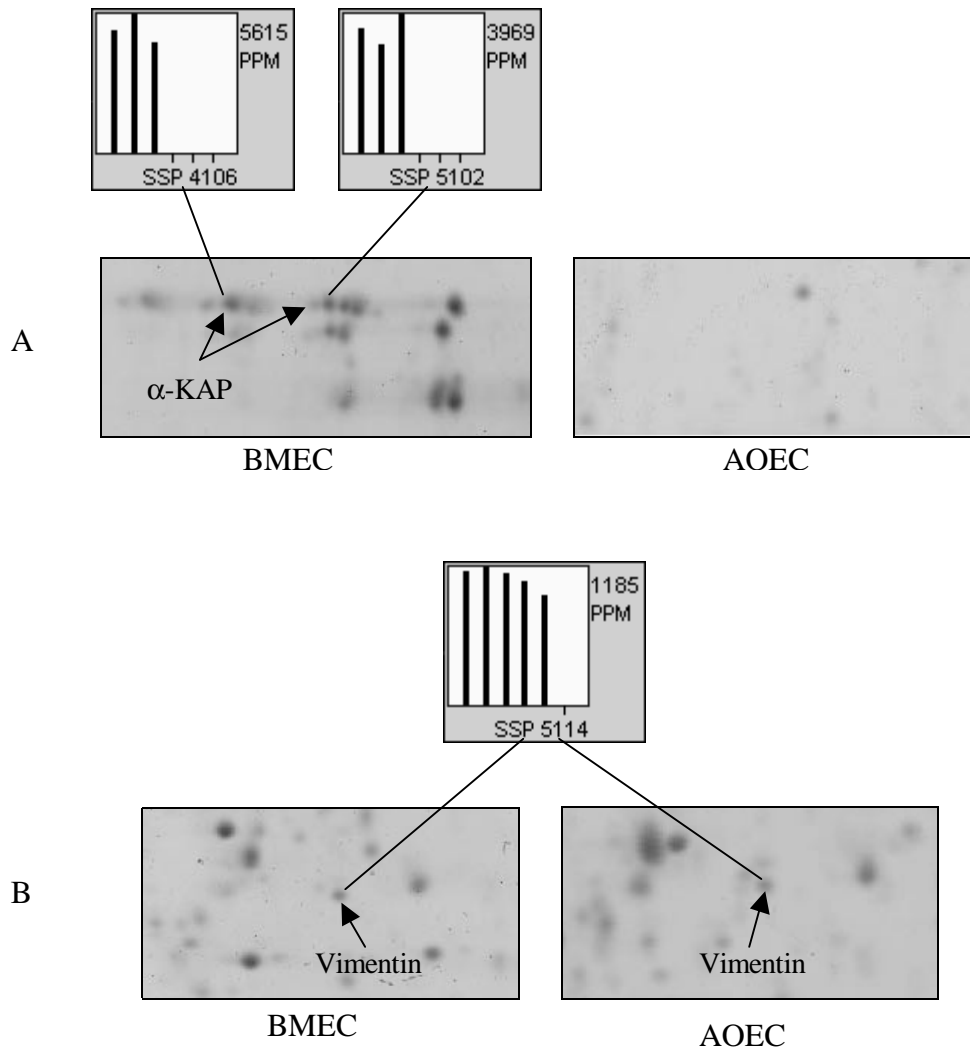


Abbildung 5.15: A, Differentielle Expression von  $\alpha$ -KAP. B zeigt einen Gelausschnitt mit einem nicht differentiellen Spot. Die linke Abbildung zeigt jeweils den Ausschnitt des BMEC-Gels, die rechte Abbildung den des AOEC-Gels. Die Ausschnitte entsprechen den Markierungen in Abbildung 5.10. Die Histogramme geben die Intensität des jeweiligen Spots in jedem Gel an. Die ersten drei Balken zeigen die Spot-Intensitäten in den BMEC-Gelen, die letzten drei die in den AOEC-Gelen.

Abbildung 5.15 zeigt Ausschnitte von BMEC- und AOEC-Gelen auf denen die differentielle Expression von  $\alpha$ -KAP zu sehen ist. Zum Vergleich wird ein Gelausschnitt gezeigt, in dem sich das nicht differentiell exprimierte Vimentin befindet.

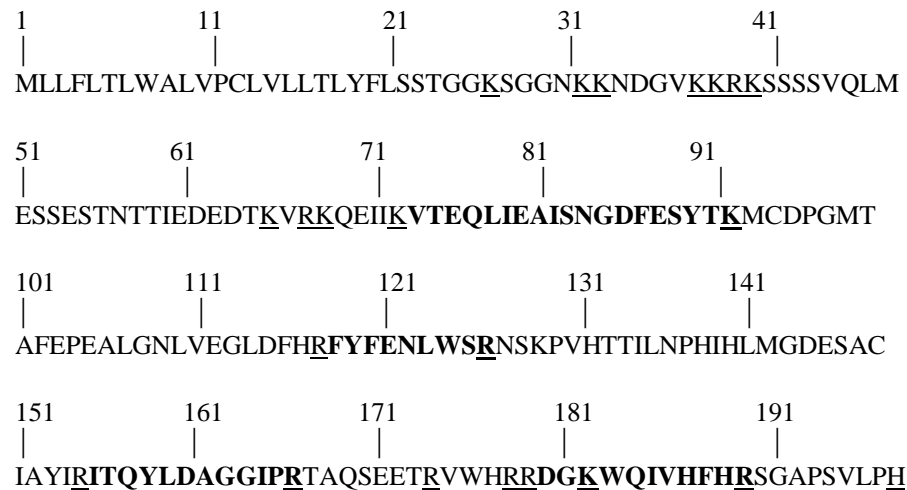


Abbildung 5.16: Aminosäuresequenz von  $\alpha$ -KAP. Aminosäuren 1 - 25 und 40 - 50 sind spezifisch für  $\alpha$ -KAP. 5 von 16 möglichen Hydrolyseprodukten wurden nachgewiesen (fett gedruckt). Die Spaltstellen für Trypsin sind unterstrichen.

#### 5.4.1 Sequenzanalyse der mRNA

Um die Identifizierung von  $\alpha$ -KAP in Hirnkapillarendothelzellen auf mRNA-Ebene zu bestätigen, wurde unter Verwendung von  $\alpha$ -KAP-spezifischen Primern, ein 220 bp langer Abschnitt von cDNA (4.3.5) aus BMECs amplifiziert und sequenziert. Die PCR wurde wie in 4.3.1 beschrieben durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden die in den Abschnitten 4.3.7, 4.3.8, 4.3.1.1, 4.3.9 und 4.3.11 beschriebenen Arbeitsschritte durchgeführt. Der amplifizierte Bereich der  $\alpha$ -KAP cDNA ist aus Abbildung 5.17 zu entnehmen.

Die Sequenzanalyse der porcinen  $\alpha$ -KAP cDNA ergab eine 95 %ige Übereinstimmung mit der murinen Form. Die Homologie auf Proteinebene beträgt 100 % (Abbildung 5.18). Eine 33-bp lange Sequenz (Nukleotid 411 - 443), durch die sich die C-terminale  $\alpha$ -KAP-Domäne von  $\alpha$ CaMKII unterscheidet, fehlt jedoch in der porcinen Form. Somit wurde in porcinen Hirnkapillarendothelzellen eine bisher nicht beschriebene Isoform von  $\alpha$ -KAP identifiziert, die im Folgenden als  $\alpha$ -KAP<sub>2</sub> bezeichnet wird. Das Verhältnis von  $\alpha$ -KAP zu  $\alpha$ -KAP<sub>2</sub> ist in Abbildung 5.19 dargestellt.

```

1  aatcgggctg caggcttctg agttgccac caccagcact ggtgacaaag atccagaggg
61  aatccccaga ctgaaacagc aacccttttg tcctggggca cactggacac ctctccaggc
121 cccaaagtca cagagccatc cccgagactg ctgagaagtg gggaatccca ggcccaccct
181 gtgggttggt gacgagggag tagacagtgg aagacgacac gtggaaggag gaagtctctc
241 gctggttgcc aagccagctc tgctccgaca gtccactact ctgctgcctg caaatgctgc
301 tctttctcac gctgtgggcc ctggtgcctt gcctgggtgtt gctaaccctc tactttctct
361 cctccacagg agggaagagc ggaggaaaca agaagaaggga tgggtgtgaag aaaagaaagt
421 ccagttccag cgttcagtta atggaatctt ctgagagcac caacaccacc attgaggacg
481 aagacaccaa agtgcgcaaa caggaaatta tcaaagtgac agagcagctg atcgaagcca
541 taagcaatgg agactttgag tcctacacga agatgtgcga ccctggaatg acagcctttg
601 aaccagaggc cctggggaac ctggtggagg gcctggactt tcatcgattc tattttgaaa
661 acttggtggtc ccggaacagc aagcccgtgc acaccacat cctgaaccct cacatccacc
721 tgatgggtga cgagtcagcc tgcatcgctt atatccgcat cactcagtac ctggatgcag
781 gcggcatacc ccgcacggcc cagtcagagg agaccgcgt ctggcaccgc agggacggca
841 aatggcagat cgtccacttc cacagatctg gggcgccctc cgtcctgccg cattgaagga
901 ccaggccagg gtccctgcgt cctcgttcgc agagatccgc tctttgtccg tggaatgtgg
961 ctgctggttc tccttttg

```

Abbildung 5.17: Nucleotidsequenz der murinen  $\alpha$ -KAP cDNA (Bayer et al., 1996).

$\alpha$ -KAP-spezifische Nukleotidsequenzen sind fett gedruckt. Die Pfeile markieren die Bindestellen der Primer ( 1:  $\alpha$ KAPas.1, 2:  $\alpha$ KAPs.1, 3: CaMK.s3).

Abbildung 5.18: Vergleich der murinen cDNA Sequenz von  $\alpha$ -KAP mit der aus porcinen Hirnkapillarendothelzellen erhaltenen Sequenz ( $\alpha$ -KAP<sub>2</sub>). Beide Sequenzen unterscheiden sich durch eine 33-bp Insertion (Nukleotid 410 - 443) in der  $\alpha$ -KAP cDNA.



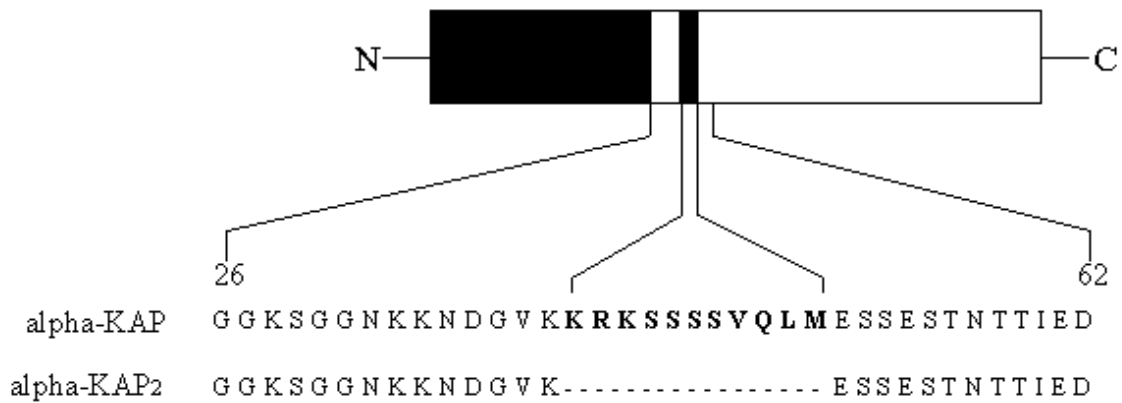


Abbildung 5.19: Vergleich von  $\alpha$ -KAP mit  $\alpha$ -KAP<sub>2</sub>. Die schwarz ausgefüllten Bereiche sind spezifisch für  $\alpha$ -KAP.

#### 5.4.2 Bestimmung der Gewebespezifität

Zur Untersuchung der gewebespezifischen Expression von  $\alpha$ -KAP<sub>2</sub> wurde porcine cDNA aus Hirnkapillarendothelzellen, Gesamthirn, Aortaendothelzellen, Herz, Colon, Milz, Plexus, Leber, Lunge, Niere, und Testis unter Verwendung der Primer  $\alpha$ KAP.as1 und CaMK.s3 amplifiziert. Dabei wurden zwei verschiedene Produktlängen erwartet, die sich um die für  $\alpha$ -KAP spezifische 33-bp-Insertion unterscheiden. Die Positionen der Primer und der amplifizierte Bereich sind aus Abbildung 5.17 zu entnehmen. Die erwarteten Produktlängen betragen 232 bp für  $\alpha$ -KAP cDNA und 199 bp für  $\alpha$ -KAP<sub>2</sub> cDNA.

Abbildung 5.20 zeigt ein Agarosegel der PCR-Produkte. Die Doppelbanden zeigen jeweils die amplifizierten Bereiche von  $\alpha$ -KAP<sub>2</sub> (untere Bande) und  $\alpha$ -KAP (obere Bande). Eine deutliche Expression von  $\alpha$ -KAP<sub>2</sub> wurde in Gesamthirn nachgewiesen. Hier ist die Signalintensität am deutlichsten von allen untersuchten Geweben. Daneben wurden schwächere Banden für Hirnkapillarendothelzellen, Colon und Milz, sowie sehr schwache Banden für Niere und Testis erhalten. Kein Nachweis von  $\alpha$ -KAP<sub>2</sub> erfolgte in Aortaendothelzellen, Plexus, Leber und Lunge.

$\alpha$ -KAP wurde dagegen in Hirnkapillarendothelzellen nachgewiesen, jedoch nicht in Gesamthirn. Außerdem wurden ein Nachweis für die Expression in Herz, Colon Milz und Testis erhalten.

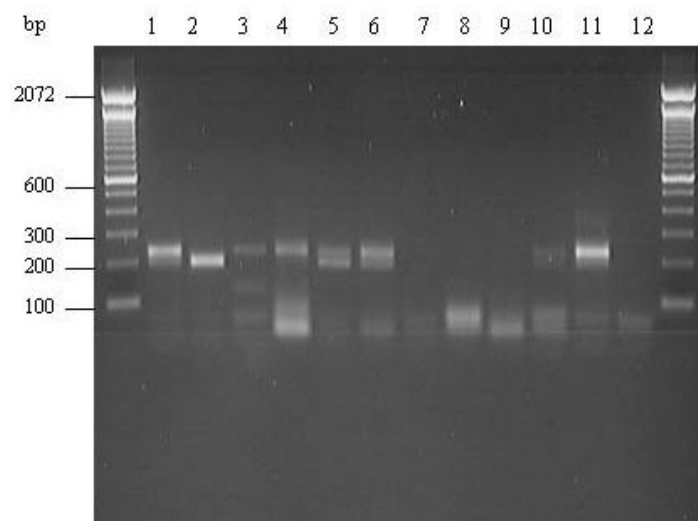


Abbildung 5.20: 2%iges Agarosegel zur Analyse der gewebespezifischen Expression von  $\alpha$ -KAP<sub>2</sub>.

- |    |            |
|----|------------|
| 1  | BMEC       |
| 2  | Gesamthirn |
| 3  | PAEC       |
| 4  | Herz       |
| 5  | Colon      |
| 6  | Milz       |
| 7  | Plexus     |
| 8  | Leber      |
| 9  | Lunge      |
| 10 | Niere      |
| 11 | Testis     |

Zur Bestimmung der gewebespezifischen Expression mit Hilfe einer Northern-Blot-Analyse wurde eine mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP markierte Sonde hergestellt (4.3.12), mit der sowohl die Detektion von  $\alpha$ CamKII-Transkripten, als auch die von  $\alpha$ -KAP- bzw.  $\alpha$ -KAP<sub>2</sub>-Transkripten möglich ist. Auf diese Weise können beide Transkripte in einer Northern-Blot-Analyse nachgewiesen und anhand ihrer Größe differenziert werden. Eine Unterscheidung der

Transkripte von  $\alpha$ -KAP und  $\alpha$ -KAP<sub>2</sub> ist aufgrund des geringen Größenunterschiedes mit dieser Methode nicht möglich..

Für die Herstellung der Sonde wurde ein 629 bp langer Abschnitt der humanen  $\alpha$ CaMKII cDNA unter Verwendung der Primer hsCaMK.Ns1 und hsCaMK.Nas1 amplifiziert (Abbildung 5.21).

```

1  ttcaggatgg ctaccatcac ctgcacccgc ttcacggaag agtaccagct cttcgaggaa
61  ttgggcaagg gagccttctc ggtggtgcga aggtgtgtga aggtgctggc tggccaggag
121 tatgctgcc aagatcatcaa cacaagaag ctgtcagcca gagaccatca gaagctggag
181 cgtgaagccc gcatctgccg cctgctgaag caccccaaca tcgtccgact acatgacagc
241 atctcagagg agggacacca ctacctgatc ttcgacctgg tcaactggtg ggaactgttt
301 gaagatatcg tggcccggga gtattacagt gaggcggatg ccagtcactg tatccagcag
361 atcctggagg ctgtgctgca ctgccaccag atgggggtgg tgcaccggga cctgaagcct
421 gagaatctgt tgctggcctc caagctcaag ggtgccgcag tgaagctggc agactttggc
481 ctggccatag aggtggaggg ggagcagcag gcatggtttg ggtttgagg gactcctgga
541 tatctctccc cagaagtgtc gcggaaggac ccgtacggga agcctgtgga cctgtgggct
601 tgtgggggtca tcctgtacat cctgctggtt ggggtacccc cgttctggga tgaggaccag
661 caccgcctgt accagcagat caaagccggc gcctatgatt tcccatcgcc ggaatgggac
721 actgtcaccc cggaagccaa ggatctgatc aataagatgc tgaccattaa cccatccaaa
781 cgcacacag ctgccgaagc ccttaagcac ccctggatct cgcaccgctc caccgtggca
841 tcctgcatgc acagacagga gaccgtggac tgctgaaga agttcaatgc caggaggaaa
901 ctgaagggag ccattctcac cacgatgctg gccaccagga acttctccgg aggggaagagt
961 gggggaaaca agaagagcga tgggtgtgaag aaaagaaagt ccagttccag cgttcagtta
1021 atggaatcct cagagagcac caacaccacc atcgaggatg aagacaccaa agtgcggaaa
1081 caggaaatta taaaagtgac agagcagctg attgaagcca taagcaatgg aggttttgag
1141 tcctacacga agatgtgcga ccctggcatg acagccttcg aacctgaggc cctgggggaa
1201 ctgggttgagg gcctggactt ccacgattc tttttgaaa acctgtgggtc ccggaacagc
1261 aagcccgtgc acaccaccat cctgaatccc cacatccacc tgatgggcga cgagtcagcc
1321 tgcatcgctc acatccgcat cacgcagtac ctggacgctg gcggcatccc acgcaccgcc
1381 cagtcggagg agaccctgtg ctggcaccgc cgggacggca aatggcagat cgtccacttc
1441 cacagatctg gggcgccctc cgtcctgccc cattgaagga ccaggccagg gtcaa

```

Abbildung 5.21: Nukleotidsequenz der humanen  $\alpha$ CaMKII, die als Matritze für die Herstellung der Northern-Blot-Sonde diente. Die Pfeile markieren die Bindestellen der Primer. Der mit der Sequenz von  $\alpha$ -KAP identische Bereich ist fett gedruckt.

Die Northern-Blot-Analyse wurde mit Gesamt-RNA aus verschiedenen porcinen Geweben (Hirnapillarendothelzellen, Aortaendothelzellen, Hirn, Colon, Herz, Milz, Leber, Lunge, Plexus und Milz), mit den in den Abschnitten 4.3.4, 4.3.13 und 4.3.14 beschriebenen Arbeitsschritten durchgeführt. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 5.22 dargestellt.

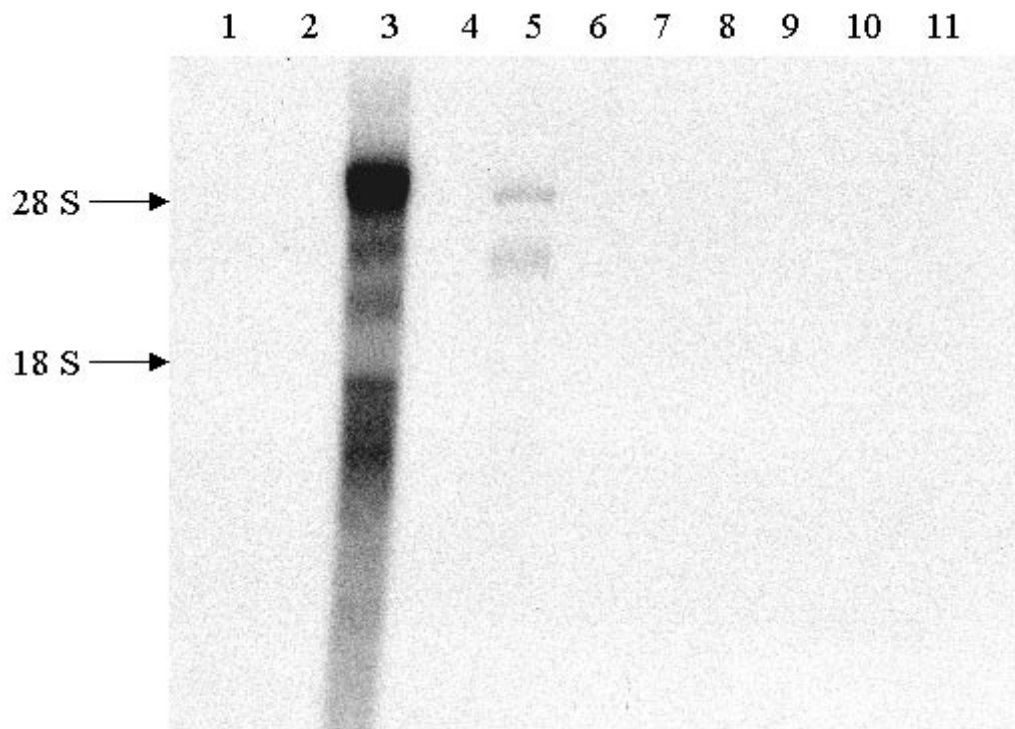


Abbildung 5.22: Northern-Blot-Analyse der Transkripte von  $\alpha$ CaMKII und  $\alpha$ -KAP/ $\alpha$ -KAP<sub>2</sub>. Es wurden jeweils 10  $\mu$ g RNA aufgetragen. Die Pfeile markieren die Laufhöhe der 28 S rRNA (ca. 5 kb) und der 18 S rRNA (ca. 2 kb).

- |    |            |
|----|------------|
| 1  | BMEC       |
| 2  | PAEC       |
| 3  | Gesamthirn |
| 4  | Colon      |
| 5  | Herz       |
| 6  | Milz       |
| 7  | Leber      |
| 8  | Lunge      |
| 9  | Plexus     |
| 10 | Milz       |
| 11 | Testis     |

Mit der Northern-Blot-Analyse wurden Transkripte mit einer Länge von etwa 4,0 und 5,0 kb in Herz und Gehirn nachgewiesen. Von Bayer et al. (1996) wurden Transkripte von 4,8 kb ( $\alpha$ CamKII) im Gehirn und 4,1 kb ( $\alpha$ -KAP) im Skelettmuskel der Maus nachgewiesen. Aufgrund der guten Übereinstimmung mit diesen Werten, handelt es sich bei den im Gehirn und Herz nachgewiesenen Transkripten mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls um

$\alpha$ CamKII- und  $\alpha$ -KAP- bzw.  $\alpha$ -KAP<sub>2</sub>-Transkripte. Daneben wurden im Gehirn Signale bei etwa 2,5 kb und 2,0 kb erhalten. In den übrigen Geweben wurden auch nach 15 stündiger Expositionsdauer des Films keine Transkripte nachgewiesen.